

Alta eficiencia de generación de animales de producción transgénicos mediante vectores lentivirales.

Romi Pena
Àrea de Producció Animal, Centre UdL-IRTA, Lleida

La generación de animales transgénicos ha contribuido extraordinariamente al avance del conocimiento en las ciencias biomédicas y agrícolas. La técnica más utilizada, la microinyección de partículas de ADN en uno de los dos pronucleos de cigotos, es utilizada rutinariamente para la generación de ratones transgénicos.

Así mismo, la generación de animales de producción transgénicos es una de las promesas más fascinantes de la biotecnología por sus múltiples aplicaciones. Su utilización potencial incluye su uso como modelo animal tanto para patologías humanas como para el estudio de procesos fisiológicos. Sin embargo, hasta muy recientemente la aplicación de esta tecnología en animales de producción se ha visto restringida por el alto esfuerzo y enorme coste económico requerido para producir uno o pocos animales. Hace dos décadas se publicaba el primer trabajo de cerdos y ovejas transgénicos (Hammer et al., 1985). La eficiencia era más baja que en ratones (1% de los cigotos microinyectados frente a un 5% en ratones), porcentaje que no ha variado en los últimos 20 años. Pese a su ineficiencia, la técnica de microinyección en pronúcleo se ha mantenido hasta la actualidad la técnica más utilizada para generar tanto ratones como animales de producción transgénicos debido a su alta repetibilidad.

Aunque se han descrito algunas técnicas alternativas, éstas no han gozado de mucha popularidad bien por sus resultados inconsistentes en el caso de la utilización de espermatozoides como transportador de ADN transgénico (Lavitrano *et al.*, 2002) o por los problemas de mortalidad embrionaria y perinatal asociados en la transferencia nuclear a partir de células transgénicas (Schnieke *et al.*, 1997 y Wilmut *et al.* 1997).



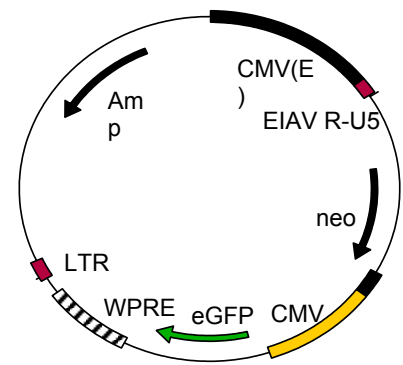
Recientemente, se ha logrado generar cerdos y terneros transgénicos a partir de vectores lentivirales (Pfeifer *et al.*, 2002; Lois *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2003). A diferencia del uso de vectores retrovirales, los lentivirus consiguen una altísima eficiencia de infección que se materializa en un espectacular porcentaje de animales positivos. Esta diferencia radica en su capacidad de infectar células independientemente de su estado de replicación. Su amplio tropismo también viene dado por la proteína de envoltura de estos virus, cuyo receptor es común a todas las células de mamífero. Una vez dentro de la célula, el genoma vírico es retrotranscrito a DNA y transportado al núcleo, donde se integra. Los lentivirus utilizados en esta tecnología son de replicación defectiva. Esto se consigue mediante la mutación de la secuencia LTR 3' lo que imposibilita la salida del virus de su lugar de integración.

La gran mayoría de los trabajos publicados sobre animales transgénicos generados con lentivirus utilizan un vector basado en el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (HIV). En colaboración con el Instituto Roslin (Escocia, Reino Unido) hemos validado la utilización de vectores derivados del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) para su uso en la generación de animales transgénicos. Para este experimento decidimos utilizar la secuencia de una proteína fluorescente de medusa (GFP: *Green Fluorescent Protein*) por la fácil detección de su expresión en animales.

El primer paso hacia la generación de virus es la clonación de la secuencia codificante para GFP en un vector plasmídico híbrido. Este plásmido contiene las secuencias necesarias

para la replicación del vector en bacterias y los elementos para el empaquetamiento de la construcción en viriones (LTR 5', LTR 3' y señal ψ de empaquetamiento). Este trabajo no difiere substancialmente de la clonación rutinaria de genes en vectores plasmídicos.

El segundo paso requiere la co-transfección transitoria de este vector con tres plásmidos de empaquetamiento que aportan, en *trans*, las proteínas estructurales y replicativas necesarias para la producción de lentivirus. La co-transfección se realiza en líneas celulares que permitan la replicación y empaquetamiento del virus, como la línea 293FT, derivada de fibroblastos de riñón humanos. Tras dos días de cultivo, se recoge, filtra y concentra el medio de cultivo en el que se encuentra el virus.



Un punto crítico para obtener altas eficiencias de transducción es el título viral. A diferencia de la labilidad de los vectores retrovirales, los lentivirus resisten sin dificultades velocidades y tiempos elevados de centrifugación, facilitando su concentración. Hay varias estrategias para estimar el título de la preparación, desde la detección de partículas virales por métodos ELISA o de PCR cuantitativa a ensayos funcionales por transducción de células y recuento de clones resistentes tras 14 días. En todo caso, es necesario que el título de la preparación esté entorno a 10^8 - 10^9 cfu/ml.

El siguiente paso es la infección de los cigotos con los lentivirus. Las dos técnicas descritas para la infección del cigoto son la microinyección de virus en el espacio perivitelino o el cocultivo de los embriones sin zona pelúcida en una solución altamente concentrada de virus. En nuestras manos, el primer método ha dado mucho mejores resultados ya que es poco invasivo y facilita la recuperación de los cigotos y su desarrollo a mórula y blastocisto. En cambio, los embriones se recuperaban mal de la exclusión física de la zona pelúcida resultando en un menor porcentaje de blastocistos sanos.

Se microinyectaron 147 cigotos obtenidos de cinco cerdas donantes. Un total de 120 se desarrollaron normalmente hasta el estado de blastocisto y fueron transferidos a cinco cerdas receptoras. Cuatro de estas hembras llegaron a final de gestación y parieron un total de 40 lechones (33% de los transferidos). De estos 40 lechones, 37 (97%) eran positivos para el transgén (detectado por PCR o Southern blotting). De estos 37 animales transgénicos, 34 expresaban GFP, visualizable como pigmentación verde al exponer la piel o los órganos a luz azul.

El análisis por Southern blotting demostró un alto grado de mosaicismos en estos animales F0. El nivel de transmisión a la F1 es alto, permitiendo establecer líneas estables de cerdos transgénicos. El alto nivel de expresión observado en los fundadores se mantiene en la siguiente generación. Este dato es vital, pues está bien descrito en retrovirus la inactivación de la expresión (*silencing*) a largo plazo. Aunque, debido al largo espacio intergeneracional, solo se tiene información de pocas generaciones, parece ser que este no es el caso con los lentivirus y que su nivel de expresión se mantiene estable de generación en generación. Este detalle es imprescindible para plantear experimentos de terapia génica o para el establecimiento de líneas de animales transgénicos.

También hemos utilizado vectores basados en el virus HIV en otros proyectos todavía en curso. Unos de ellos utilizan una estrategia de RNA de interferencia para bloquear la expresión de varios genes endógenos. La horquilla de RNA se expresa a partir de un promotor dependiente de la polimerasa III. El objetivo del otro proyecto es reproducir una patología ocular humana en cerdos transgénicos. Estos animales serán utilizados en experimentos de terapia génica. El mayor tamaño del ojo (respecto al ratón) facilita la labor de los cirujanos que administran esta terapia en el espacio periretinal.

El desarrollo de vectores lentivirales capaces de transferir ADN transgénico a un amplio espectro de células ha avivado de nuevo las viejas expectativas que esta tecnología puede aportar a la biotecnología animal. Uno de los factores limitantes más importantes es el tamaño del ADN que puede ser clonado en estos vectores (10 Kb máximo, aunque a partir de 6 Kb se consiguen titulaciones virales más reducidas). Por lo tanto, las construcciones con cDNAs o de ARN de interferencia son las más adecuadas para estos vectores. Aún con todo, las posibilidades comprenden tanto el uso como modelo animal, como la prevención de enfermedades infecciosas en animales de producción o el estudio de genes candidatos de relevancia en caracteres de producción. Quizás el avance más importante es que la reducción de costes para la generación de animales de producción transgénicos puede, por fin, abrir las puertas de esta tecnología a la comunidad académica.

REFERENCIAS:

- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall, RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD y Brinster RL (1985) *Nature* 315, 680-683.
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Selbad H, Wenigerkind A, Brem G, Wolf E y Pfeifer A (2004) *Biol Reprod.* 71(2), 405-9.
- Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, DiStefano C, Fioretti D, Giancotti P, Marfe G, Pucci L, Renzi L, Wang H, Stoppacciaro A, Stassi G, Sargiacomo M, Sinibaldi P, Turchi V, Giovannoni R, Della Casa G, Seren E y Rossi G (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 14230-14235.
- Lois C, Hing EJ, Pease S, Brown EJ y Baltimore D (2002) *Science* 295, 868-872.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y y Verma IM (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2140-2145.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott A, Ritchie M, Wilmut I, Colman A y Campbell KH (1997) *Science* 278, 2130-2133.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) *Nature* 385, 810-813.